

รายงานเชิงเทคนิค ฝ่ายสถานีวิจัย สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

Technical Report, Research Facility Division

ชื่อเรื่อง (Title)	การศึกษาสารประกอบแคลเซียมในเปลือกไข่และนมผงด้วยเทคนิค XANES
ส่วนงาน (Section)	ระบบลำเลียงแสงที่ 8
วันที่รายงาน (Date of Report)	25 ธันวาคม 2561
ระดับการเปิดเผยข้อมูล (Level of Disclosure)	☐ ข้อมูลในรายงานเป็นความลับ (Undisclosed) ☒ เปิดเผยข้อมูลเฉพาะภายในส่วนงาน (Information can be disclosed within section) ☐ เปิดเผยข้อมูลได้สำหรับพนักงานของสถาบันฯ และอนุญาตให้บันทึกข้อมูลเข้าเป็นส่วนหนึ่งของระบบ Knowledge Management ภายในสถาบันฯ (Information can be disclosed for SLRI staffs and can be part of SLRI's Knowledge Management System) ☐ เปิดเผยข้อมูลได้เพื่อเป็นองค์ความรู้สาธารณะ เช่น เว็บไซต์ของสถาบันฯ (Information is available for public)

รายชื่อผู้ดำเนินโครงการและจัดทำรายงาน Name	ส่วนร่วมในการปฏิบัติงานในโครงการ (Optional) Responsible tasks in the project (optional)
ดร. เพ็ญพิชชา อมรภัทรกิจ*	65
นางสาวชนากานต์ ชลสุข	25
ดร. วันทนา คล้ายสุบรรณ	10

*ผู้ให้ข้อมูล (Corresponding person)

การศึกษาสารประกอบแคลเซียมในเปลือกไข่และนมผงด้วยเทคนิค XANES

ดร. เพ็ญพิชชา อมรภัทรกิจ*

นางสาวชนากานต์ ชลสุข

ดร. วันทนา คล้ายสุบรรณ

ส่วนงานระบบลำเลียงแสงที่ 8: เทคนิคการดูดกลืนรังสีเอกซ์

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

25 ธันวาคม 2561

1. บทนำ

แคลเซียม (Calcium, Ca) เป็นแร่ธาตุที่สำคัญและพบได้ในชีวิตประจำวัน เช่นแคลเซียมในกระดูกคน สัตว์ และอาหารที่รับประทาน ซึ่งร่างกายของสิ่งมีชีวิตใช้แคลเซียม 99% ในการสร้างกระดูกและฟันให้มีความแข็งแรงส่วนอีก1% จะพบในเลือดและเนื้อเยื่อ ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย โดยแคลเซียมในร่างกายจะพบในรูป multiple hydroxy apatite salt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ของแคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate (CaCO_3)) ที่เรียงตัวกันแบบ crystal lattice ในขณะที่แคลเซียมที่พบในเปลือกของสิ่งมีชีวิต เช่นเปลือกหอยและเปลือกไข่ จะพบในรูป CaCO_3 เป็นหลัก [1] ปี ค.ศ. 2013 Rajendran และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเคมีของกระดูกในธรรมชาติ ได้แก่ กระดูกแกะ กวาง วัว หมู ไก่ และ เลียงผา ที่ไม่ผ่านการเผา และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 400 และ 700 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค X-ray Absorption Near Edge Structure (XANES) Spectroscopy พบว่าสเปกตรัมของ Ca K-edge ของกระดูกสัตว์ทุกชนิดต่างสอดคล้องกับองค์ประกอบเคมีของ beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) และ hydroxyapatite (HA) นอกจากนี้ในปี 2017 สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนได้จัดกิจกรรมค่ายครูวิทยาศาสตร์ ส่วนงานระบบลำเลียงแสงที่ 8 [3] ได้ทำการทดลองวัดสเปกตรัม XANES ของธาตุแคลเซียมในกระดูกปลา กระดูกวัว และแคลเซียมเม็ด (อาหารเสริม) พบว่า แคลเซียมในกระดูกปลาและวัวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajendran และคณะ [2] ส่วนแคลเซียมในอาหารเสริมนั้นมีองค์ประกอบของ CaCO_3 เป็นหลัก

เทคนิค XANES เป็นเทคนิคสำหรับศึกษาบริเวณขอบการดูดกลืนของอะตอม จนถึงช่วงพลังงานโฟตอนประมาณ 40-50 eVเหนือขอบการดูดกลืน โครสสร้าง XANES นั้น มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างพลังงานของอะตอมและความหนาแน่นของสถานะพลังงานที่ว่างในระบบที่พิจารณา เช่น อะตอมในโลหะและอะตอมในโมเลกุล เป็นต้น รูปร่างของโครงสร้าง XANES จึงมีความเฉพาะเจาะจงกับสภาพแวดล้อมทางเคมีของอะตอม สามารถใช้วิเคราะห์ชนิดเคมีของอะตอม และแยกองค์ประกอบเคมีในสารตัวอย่างได้ [4]

ดังนั้นในกิจกรรม ASEAN Synchrotron Science Camp 2018 ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนได้จัดขึ้นระหว่างวันที่ 26-30 พ.ย. 2561 ส่วนงานระบบลำเลียงแสงที่ 8 ได้เข้าร่วมกิจกรรมดังกล่าวโดยกำหนดหัวข้อการทดลองให้กับผู้เข้าร่วมกิจกรรมให้แตกต่างจากปี 2017 คือ การศึกษาการดูดกลืนรังสีเอกซ์ของธาตุแคลเซียมในเปลือกไข่และนมผง โดยจัดเตรียมเปลือกไข่ตากแห้ง (egg shell) และนมผง (milk powder) รวมทั้งสารประกอบแคลเซียมหลายชนิดที่จะนำมาเป็นสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล XANES ซึ่งมีวัตถุประสงค์ คือ การให้ผู้เข้าร่วมกิจกรรมได้ทำความเข้าใจโครงสร้างอะตอม หรือองค์ประกอบทางเคมีของ Ca ในแต่ละตัวอย่างที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป และมีความเข้าใจขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับเทคนิค XAS และการศึกษาโครงสร้าง XANES เพื่อนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยของผู้เข้าร่วมกิจกรรมต่อไป

2. ลักษณะการดำเนินงาน

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างจากเปลือกไข่

1. ทำการล้างเปลือกไข่ด้วยน้ำ DI
2. นำเปลือกไข่ที่ได้ไปตากให้แห้งเป็นระยะเวลา 1 วัน
3. นำเปลือกไข่ที่แห้งสนิท เก็บในตู้ดูดความชื้น เป็นระยะเวลา 5 วันหลังจากนั้น เราจะได้เปลือกไข่แห้ง
4. ทำการบดเปลือกไข่ด้วยเครื่อง mini milling และครกบดสารหลังจากนั้นเราจะได้ผงของเปลือกไข่ (egg shell)

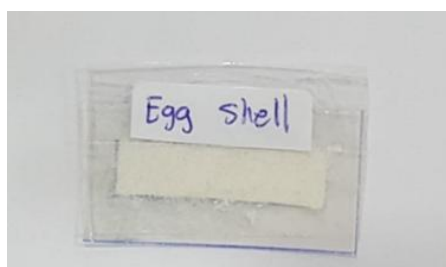
2.2 วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดแบบ Transmission (TM) mode

รายการสารมาตรฐาน: CaCO_3 , CaO , CaHPO_4 , $\alpha\text{-TCP}$, $\beta\text{-TCP}$ และ hydroxyapatite (HA)

รายการสารตัวอย่าง: egg shell

1. ทำการบดสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างด้วยครกให้ละเอียด
2. ทำการเตรียมตัวอย่าง โดยติด nitto tape ไว้ด้านหนึ่งของเฟรม
3. ใส่สารตัวอย่างลงไปในช่วงว่างของเฟรมและทำการเกลี่ยสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยระวังไม่ให้มีอากาศ หรือช่องว่างอยู่ภายใน
4. ติด nitto tape อีกด้านหนึ่งและทำการเขียนชื่อของสารตัวอย่างให้เรียบร้อย ดังรูปที่ 1

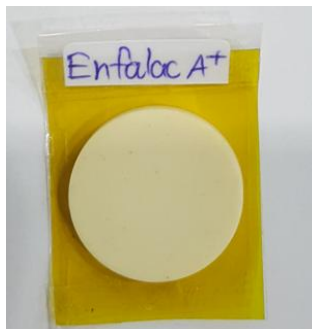


รูปที่ 1 ตัวอย่างของสาร (egg shell) ที่ทำการเตรียมสำหรับการวัดแบบ TM mode

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดแบบ Fluorescent (FL) mode

รายการสารตัวอย่าง: milk powder

1. ทำการบดสารตัวอย่างด้วยครกให้ละเอียด
2. ทำการอัดขึ้นรูปให้เป็นเม็ดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร
3. ทำการติดตัวอย่างลงบน kapton tape ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ตัวอย่างของสาร (milk powder) ที่ทำการเตรียมสำหรับการวัดแบบ FL mode

การวัดตัวอย่างสำหรับวัดแบบ Transmission (TM) mode

1. ทำการเซทระบบสำหรับการวัด Ca K-edge โดยใช้ผลึก Ge (220) #01 และทำการเติมแก๊ส N₂ (160 mbar) และ He ใน I₀ chamber และทำการเติมแก๊ส N₂ (872 mbar) และ He ใน I₁ chamber ให้ได้ 1 atm
2. ทำการปรับค่าพลังงานโฟตอนด้วยเครื่องคัดเลือกพลังงานแสง (DCM) ไปที่ 4038.5 eV ซึ่งเป็นค่าพลังงานขอบการดูดกลืนของ Ca หลังจากนั้นทำการปรับมุมของผลึกเพื่อให้รังสีเอกซ์มีความเข้มสูงสุด (maximization of I₀ signal) และใช้กระดาษ burn paper ติดบน sample holder ที่อยู่ใน sample chamber แล้วเปิดแสงเป็นระยะเวลา 3 นาที พร้อมกับเปิดให้แก๊ส He ไหลผ่านใน sample chamber ก็จะสามารถหาตำแหน่งของแสงได้จากแถบสีดำบน burn paper
3. ทำการปรับเทียบการอ่านค่าพลังงานโฟตอนของเครื่อง DCM โดยใช้ white line peak position ของ CaCO₃ powder (4049 eV) [2]
4. ทำการวัดสเปกตรัม XANES ของสารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง egg shell โดยใช้ scan parameter ดังนี้

รายงานเชิงเทคนิค ฝ่ายสถานีวิจัย สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

การศึกษาสารประกอบแคลเซียมในเปลือกไข่และนมผงด้วยเทคนิค XANES

ระบบลำเลียงแสงที่ 8 วันที่รายงาน 25 ธันวาคม 2561

E₀ (eV): 4038.5, energy (eV) relative to E₀: -100, -20, 80, 200, energy step (eV): 5, 0.2, 5; timestep (s): 1, 1, 1 และเปิดให้แก๊ส He ไหลผ่านใน sample chamber ขณะวัดสเปกตรัม

การวัดตัวอย่างสำหรับวัดแบบ Fluorescent (FL) mode

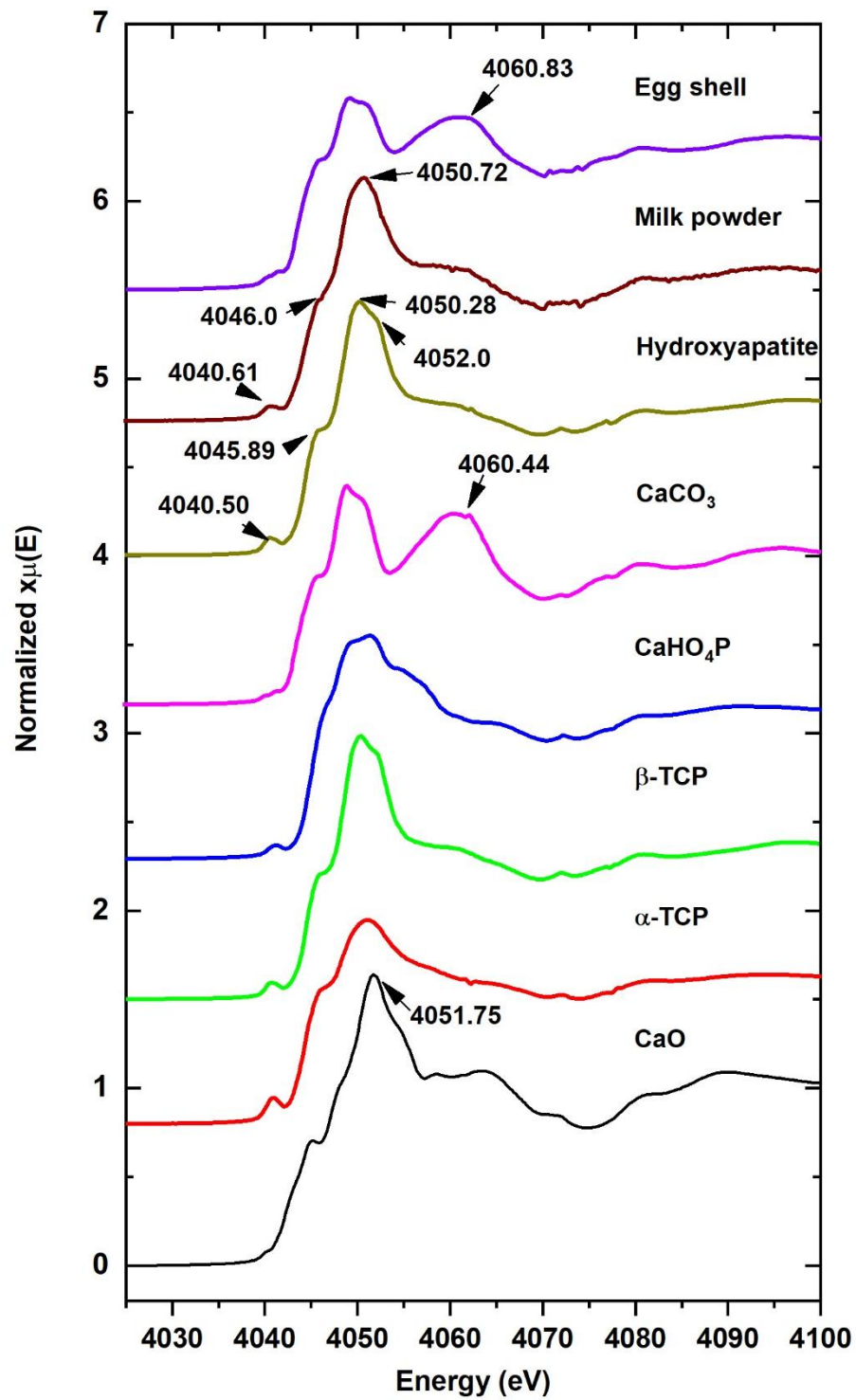
1. ทำการเซตระบบตามข้อที่ 1-3 ของการวัดแบบ Transmission (TM) mode
2. ทำการปรับเทียบการอ่านค่าพลังงานโฟตอนของ Ge detector โดยใช้ emission line ของ Ca K α_1
3. ทำการวัดสเปกตรัม XANES ของสารตัวอย่าง milk powder โดยใช้ scan parameter ดังนี้

E₀ (eV): 4038.5, energy (eV) relative to E₀: -100, -20, 80, 200, energy step (eV): 5, 0.2, 5; timestep (s): 3, 3, 3 และเปิดให้แก๊ส He ไหลผ่านใน sample chamber ขณะวัดสเปกตรัม

3. ผลการทดลอง

3.1 Ca K-edge ของสารตัวอย่าง (egg shell และ milk powder) เมื่อทำการเทียบกับสารมาตรฐาน

จากการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารมาตรฐานต่างๆ และสารตัวอย่าง egg shell และ milk powder ดังรูปที่ 3 พบว่าลักษณะสเปกตรัมของสารมาตรฐานสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajendran และคณะ [2] และ Pascolo และคณะ [5] โดยตำแหน่ง pre-edge, shoulder และ white line peak ของ HA มีค่า 4040.50, 4045.89 และ 4050.28 eV ตามลำดับ และมีลักษณะสเปกตรัมใกล้เคียงกับ beta-TCP และ alpha-TCP ในขณะที่ CaCO₃ มีพีคการดูดกลืนหลัง white line ที่ชัดเจน และมีค่าพลังงานที่ 4060.44 eV (4060.50 eV [2]) ส่วน CaO มีค่า white line peak ที่ 4051.75 eV (4051.73 eV [2]) ในส่วนสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นพบว่าลักษณะสเปกตรัมของ milk powder มีความใกล้เคียงกับ pre-edge, white line และ post-edge ของ beta-TCP, alpha-TCP และ HA ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Rajendran และคณะ [2] แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารตัวอย่าง egg shell กับสารมาตรฐานต่างๆ พบว่าลักษณะสเปกตรัมของสารตัวอย่างทั้งสองมีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน CaCO₃ และแคลเซียมในอาหารเสริม [3]



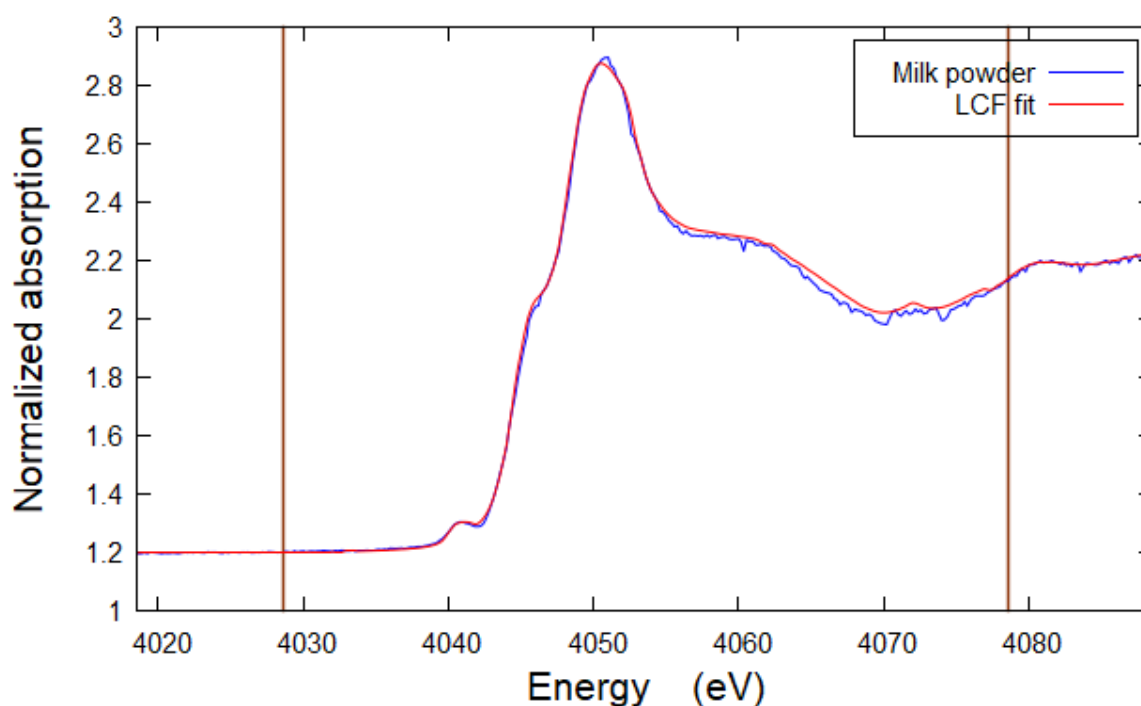
รูปที่ 3 XANES spectra ของ Ca K-edge ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

3.2 Linear combination fitting (LCF)

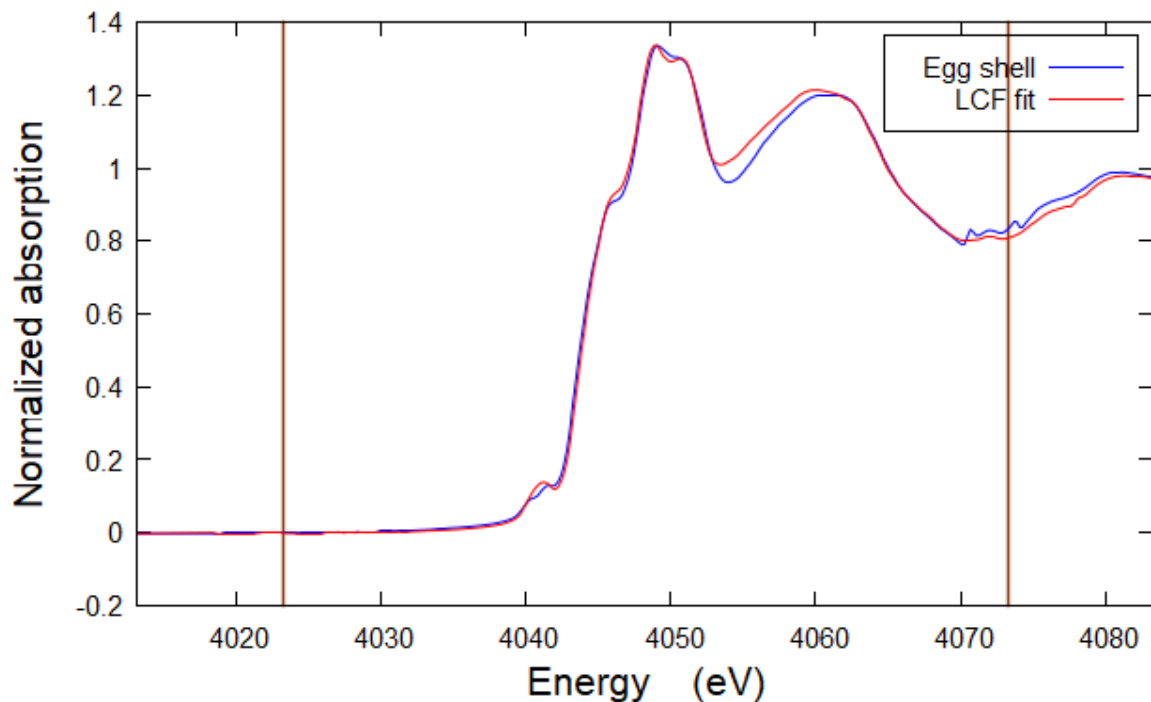
เมื่อนำสเปกตรัมของสารตัวอย่างต่างๆ มาทำ Linear combination fitting กับสารมาตรฐาน (ตารางที่ 1 รูปที่ 4 และ 5) เพื่อศึกษาปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของสารตัวอย่างว่าประกอบด้วย Ca โครงสร้างไหนบ้าง และมีปริมาณกี่ atomic% พบว่า milk powder ประกอบด้วย beta-TCP และ HA เป็นองค์ประกอบหลัก และมี CaHPO_4 , CaCO_3 และ CaO ปนอยู่เล็กน้อย โดยมีค่า R-factor อยู่ที่ 0.0029 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า HA และ TCP นั้น เป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่พบได้ในมากในน้ำนมและกระดูกของสิ่งมีชีวิต [1, 3] ในขณะที่ egg shell พบว่ามีโครงสร้างของ CaCO_3 (มากกว่า 73%) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ก็พบ CaO และ alpha-TCP โดยมีค่า R-factor อยู่ที่ 0.006 ซึ่งผลที่ได้ก็นั้นแตกต่างกับโครงสร้างของ Ca ที่อยู่ในตัวอย่าง milk powder

ตารางที่ 1 ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของสารตัวอย่าง เมื่อทำการ Fit กับสารมาตรฐาน

Sample	Percentage of calcium atoms in standard						R-factor
	HA	Beta-TCP	Alpha-TCP	CaHPO_4	CaCO_3	CaO	
Milk powder	32.4±1.5	29.4±1.3	0	15.4±2.3	12.8±1.2	10.0±2.4	0.0029
Egg shell	0	0	21.9±11.6	0	73.0±1.9	5.2±2.8	0.0060



รูปที่ 4 Linear combination fitting ของ Ca K-edge ของนมผงและสารมาตรฐาน



รูปที่ 5 Linear combination fitting ของ Ca K-edge ของเปลือกไข่และสารมาตรฐาน

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสารประกอบของ Ca ในสารตัวอย่างนั้น พบว่า นมผง (milk powder) นั้น ประกอบด้วย HA และ TCP ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นโครงสร้างหลักที่พบได้ในน้ำนมของสิ่งมีชีวิต ส่วนเปลือกไข่พบ Ca ในโครงสร้าง CaCO_3 เป็นหลัก ซึ่งต่างจากที่พบในนมผง

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] <https://www.siamchemi.com> (2018.12.03)
- [2] J. Rajendran et al., Mater. Sci. Eng C, 33 (2013) 3968.
- [3] ดร. เพ็ญพิชชา อมรภัทรกิจ และคณะ, กิจกรรมค่ายครูวิทยาศาสตร์ 2017: การศึกษาสารประกอบแคลเซียมในกระดูกและยาเสริมอาหารด้วยเทคนิค XANES, 2017
- [4] ดร. วันทนา คล้ายสุบรรณ, เทคนิคการทดลอง X-ray Absorption Spectroscopy ณ ห้องปฏิบัติการแสงสยาม, 2012
- [5] L. Pascolo et al., Scientific Reports, 4:6540 (2014) 1.